



BIOLOGY CENTRE CAS

Institute of Parasitology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

IBAN – CZ24 0800 0000 0000 0606 3942 | SWIFT CODE – GIBACZPX | VAT No.: CZ60077344

phone: +420 387 775 403 | fax: +420 385 310 388 | www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Posudek na diplomovou práci studentky Bc. Dieu Hien Ho, jež byla zaměřena na studium funkce proteinu MLQ v rámci savčího komplexu F_0F_1 ATP syntázy.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Práce se zabývá charakterizací změn, které nastávají v lidských buňkách po knock-outu proteinu MLQ, jenž je podjednotkou komplexu F_0F_1 ATP syntázy. K utišení exprese, či delecí genu pro protein MLQ si autorka vybrala dvě nezávislé metody, RNAi a CRISPR/Cas9. Jelikož RNAi nebyla dostatečně efektivní, autorka dále pokračovala s liniemi, ve kterých došlo k mutaci (delecí, či inserci) v genu pro MLQ díky zavedenému systému CRISPR/Cas9. Otestovala desítky linií a vybrala si 3-4 linie, se kterými dále pracovala. Studovala změny jak ve strukturní integritě komplexu F_0F_1 ATP syntázy, tak také změny na buněčné úrovni. Práce je metodicky bohatá a prezentuje výsledky vynikající metodické úrovně. Rozsah práce je naprosto dostačující pro diplomovou práci a je dokladem vysokého pracovního nasazení a píle studentky.

Formální kvalita

Naprosto v pořádku, našla jsem jen pár drobností. Studentka používá stechiometrie, místo stochiometrie, či stoichiometrie, když popisuje počet jedné podjednotky v rámci komplexu. Myslím si, že se více používá slovo „stochiometrie“, stechiometrie jsem našla, že se používá ve španělštině a slovenštině, avšak i tam velice vzácně.

Str. 25 – 1. odstavec – pochybuji, že květy byly polystyrenové

Str. 26, 6. řádek – chybí číslo obrázku, na který je odkázáno

Str. 51 – chybí odkaz na sekci v rámci metodiky (napsané viz sekce XY – metody)

Str. 52, 9. řádek - chybí číslo obrázku, na který je odkázáno

Formální kvalita předloženého spisu

Formálně je práce na vysoké úrovni včetně obrázků, tabulek a doprovodných legend.

Jazyk

Bez prohřešků proti českému jazyku, napsáno velice čtivě a pěknou češtinou.

Hodnocení předkládané práce

1. Literární přehled

Literární přehled je napsaný velice hezky, poutavě a pokrývá všechny oblasti, které jsou nutné k pochopení práce jako takové. Líbila se mi sonda do historie, jelikož toto vždy text osvěží a dá do širšího kontextu. Studentka prokázala výborný přehled a zpracovala značné množství literatury.



2. Materiál a metody

Velice podrobně popsány, oceňuji pečlivost studentky při popisu složení pufrů. Text je formulačně velice hezky zvládnut. Oceňuji také výborný popis jak fungují instrumenty Oroboros a Seahorse.

Otázky:

- a. Ověření úspěšnosti metody CRISPR/Cas9 studentka dělala pomocí kitu Surveyor Mutation Detection kit. Tuto metodiku plně chápu u vyselektované linie, jež je mixem různých buněk. Nicméně u klonálních liniích, které byly dale studovány, nebylo by dobré ověřit přerušeni/mutaci v genu pro MLQ protein pomocí PCR a následného osekvenování?
- b. Proč jste použili dvě různé sondy pro detekci mitochondriálně kódovaných transkriptů (EvaGreen) a jaderně kódovaných transkriptů (TaqMan) metodou qPCR?

3. Výsledky

Naprosto v pořádku, linie experimentálního příběhu je logická a na sebe navazující. Všechny experimenty jsou řádně zdůvodněny.

Otázky:

- a. Obr. 18B – pokud jsou hodnoty normalizovány na aktin a vztaženy ke kontrolní linii pLKO NS2, neměly by být hodnoty v rámci této linie 100% ? (tmavě modrý sloupec v grafu)
- b. Pro lepší grafické znázornění bych možná doporučila použít log₂ protein ratio, jak například používají v práci He at al., PNAS 114(34):9086 – 9091
- c. Obr. 19A – co znamená HEK STD?
- d. Obr. 21A versus Obr. 23 – Jak si autorka vysvětluje, že na SDS PAGE nebyl detekován žádný signál pro podjednotku *a*, nicméně na nativním western je jasný signal pro tuto podjednotky?
- e. Str. 63 – u textu není jasné, zda patří k experiment s Oroboros, či se Seahorse. Pokud jsem dobře pochopila, obsah DNA byl měřen v případě experimentu se Seahorse, jelikož buňky byly inkubovány na destičce po delší dobu.
- f. Obr. 32 - text na str. 65 uvádí, že glykolytická kapacita je u MLQ KO přibližně dvojnásobná oproti WT buňkám, což mi přijde, že neodpovídá grafickému znázornění.
- g. Existuje důvod, proč nebyla změřena hladina transkriptu pro COX1 and COX2 metodou qPCR?
- h. Obr. 36 – chybové úsečky pro kontrolní HEK293 jsou velice vysoké, proč a jak toto vylepšit?

4. Diskuze



Napsána velice hezky, srozumitelně a čtivě.

Otázky:

- a. Jaký je rozdíl mezi Crabtree a Warburg efektem?
- b. Pokud dochází k navýšení glykolytické kapacity u buněk s vypnutým MLQ proteinem, dochází ke změnám na úrovni transkripce a translace glykolytických enzymů? Jak se navýší glykolytická aktivita buňky?
- c. Efekt knock-out MLQ proteinu na hladinu proteinů COX1, 2, 3 je zajímavý. Otázkou zůstává, zda je již ovlivněna transkripce genů, což díky qPCR analýze ATP6-COX3 transkriptu nevypadá, či dochází k degradaci již transkribovaných mRNA. Mohla by studentka navrhnout experiment, jak by se dal tento zajímavý jev dále zkoumat?
- d. Na straně 73, 2. odstavec, řádek 18 studentka píše, že v buňkách, které byly tady studovány, protein MLQ zcela chybí. Toto tvrzení považují za trochu přeceněné, jelikož to, že protein nebyl detekován Western analýzou, ještě neznámá, že naprosto chybí. Studentka také neprokázala, že její studované linie jsou opravdu knock-outy. Jak by se toto dalo ukázat?
- e. Mohla by studentka zaspokulovat, proč proteiny MLQ a DAPIT jsou přítomny pouze u savčího komplexu a nikoliv u jiných organismů ?
- i. V rámci úvodu studentka popisuje asemblaci komplexu F_0F_1 ATP syntázy, jež byla studována převážně u kvasinek. Práce He et al., PNAS 114(34):9086 – 9091, která popisuje komplex F_0F_1 ATP syntázy po vypnutí podjednotky c tento model sestavování komplexu však příliš nepodporuje, jelikož komplex je sestaven až na podjednotky a, DAPIT a pravděpodobně MLQ. Proč se sestavování komplexu F_0F_1 syntázy liší mezi savčí buňkou a kvasinkou a mohla by studentka navrhnout model pro sestavení savčího komplexu na základě dostupných dat?

Závěr

Dle názoru oponenta je předložená práce na vynikající úrovni a je vizitkou péle, pracovitosti a zaujetí studentky, ale také výborného vedení jejího školitele a celého oddělení.

Práci doporučuji k obhajobě a těším se osobní setkání se studentkou.

V Českých Budějovicích dne 8.9.2017

RNDr. Alena Panicucci Zíková, PhD

